

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-100289

(43)Date of publication of application : 15.04.1997

(51)Int.Cl.

C07G 17/00  
A61K 35/74  
C12N 15/09  
C12P 1/04  
// C12N 1/20  
(C12P 1/04  
C12R 1:38 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:38 )

(21)Application number : 07-279787

(71)Applicant : FUJISAWA PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 02.10.1995

(72)Inventor : NAKAJIMA SHUSUKE

SATO BUNJI

HORI YASUHIRO

FUJITA TAKASHI

TAKASE SHIGEHIRO

TERANO HIROSHI

(54) NEW COMPOUND FR190895, FR190872 AND FR190873, THEIR PRODUCTION AND USE THEREOF

(57)Abstract:

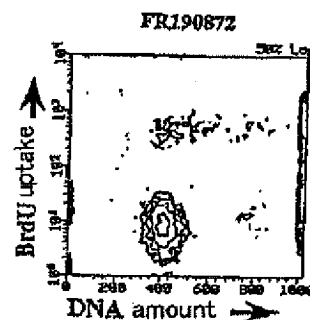
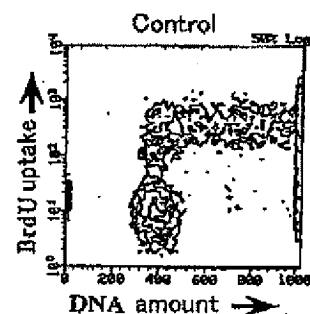
PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compounds, capable of inducing the expression of a protein for inhibiting cyclin-dependent kinases independently of a tumor suppressor gene product p53 by culturing a compound microorganism belonging to the genus *Pseudomonas* in a culture medium.

SOLUTION: The new compounds are FR190895 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> having 102-105° C melting point), FR190872 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> having 104-107° C melting point) and FR190873 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>). The compounds are obtained by culturing a microorganisms, belonging to the genus *Pseudomonas* and capable of producing at least one compound of the FR190895, FR190872 and FR190873, etc., [e.g. *Pseudomonas chlororaphis* No.4306 strain (FERM BP-5232)] in a nutrient culture medium and collecting the resultant product from the obtained cultured product. The compounds are readily soluble in methanol, chloroform and dimethyl sulfoxide and insoluble in water and capable of manifesting the positivity to the cerium sulfate and iodine vapor reactions and the negativity to the ninhydrin, ferric chloride and Molisch reactions. All of the compounds are a light-yellow powder.

**[0026] Test experiment 4 [Effect of FR190872 on a cell cycle in a human cancer cell line]**

HT29 cells ( $1 \times 10^6$ ) were put in a cell culture plate (100×20 mm, FALCON®, Becton, Dickinson and Company), and cultured in Dul complete medium, in the presence of FR190872 (500µg/ml) at 37°C, in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, for 16 hours. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) solution (1mg/ml PBS) was added into said medium to give 30µg/ml of final concentration. Then HT29 cells were cultured for further 30 minutes and allowed to uptake BrdU into their DNA. The HT29 cells were collected with trypsin, washed with PBS and resuspended into 500µl of PBS. 5ml of Cold 70% aqueous ethanol was added into the cell suspension with stirring, then the suspension were left at 4°C for 30 minutes to fix the cells. **[Figure 14]**

After washed with PBS containing 0.5% calf serum and 0.1% Tween20 (Nacalai Tesque, Inc.) (hereinafter wash solution), isolated nuclei of the test cells were suspended in 700µl of 4N HCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and left at room temperature for 30 minutes. The suspension was neutralized with 700µl of 0.1N sodium tetraborate solution (Nacalai Tesque, Inc.), and the nuclei were washed with the wash solution, then suspended in 20µl of fluorescein-labeled anti-BrdU antibody solution (Becton, Dickinson and Company), and allowed to react at room temperature for 30 minutes. After washed with the wash solution, DNA of the isolated nuclei treated with the antibody was stained with propidium iodide solution (10µg/ml PBS, Sigma). The effect of FR190872 on transition of cell cycle was estimated by measuring the rate of synthesizing DNA and the amount of DNA using FACS (Becton, Dickinson and Company). The result is shown in Figure 14. No increase in the amount of DNA and the BrdU uptake was observed, indicating that FR190872 treated cell was arrested on G1 phase.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-100289

(43) 公開日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 G 17/00			C 0 7 G 17/00	C
A 6 1 K 35/74	ADU		A 6 1 K 35/74	ADUF
C 1 2 N 15/09			C 1 2 P 1/04	A
C 1 2 P 1/04			C 1 2 N 1/20	A
// C 1 2 N 1/20		9162-4B	15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 21 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-279787	(71) 出願人	000005245 藤沢薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
(22) 出願日	平成7年(1995)10月2日	(72) 発明者	中島 秀典 茨城県つくば市緑が丘20-2
		(72) 発明者	佐藤 文治 茨城県つくば市竹園3-24-1 512棟304号
		(72) 発明者	堀 康宏 茨城県筑波郡谷和原村絹の台6-3-13
		(72) 発明者	藤田 隆 茨城県土浦市永国1125-10
		(74) 代理人	弁理士 高島 一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規化合物 F R 190895、F R 190872 及び F R 190873、その製造方法およびその用途

## (57) 【要約】

【課題】 細胞周期阻害活性、抗腫瘍活性を有する化合物およびその製造法の提供；医薬組成物、特に細胞周期阻害剤および抗腫瘍剤の提供。

【解決手段】 細胞周期阻害活性ひいては抗腫瘍活性を有する化合物 F R 190895、F R 190872 および F R 190873、シュードモナス属に属する1以上の該化合物の生産菌を培地に培養することによる該化合物の製造方法、1以上の該化合物を含有する医薬組成物、並びに1以上の該化合物を含有する、細胞周期阻害剤および抗腫瘍剤に関する。

【効果】 本発明の化合物は、細胞周期阻害活性及び強い抗腫瘍活性を示し、哺乳動物に対して、経口又は非経口投与により癌化学療法に使用し得る。

## 【特許請求の範囲】

\* 95、FR190872及びFR190873からなる

【請求項1】 以下の性質を有する化合物FR1908\* 群より選択される化合物。

## (1) FR190895

a) 形状: 淡黄色粉末

b) 分子式:  $C_{23}H_{21}N_2O_7$ 

c) 融点: 102-105°C

d) 分子量: 440 [FAB-MS: m/z 441 (M+H)]

e) 紫外線吸収スペクトル: 図1に示す

 $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH): 220 (sh), 273, 305 (sh) nm

f) 赤外線吸収スペクトル: 図2に示す

 $\nu_{max}$  (KBr): 3370, 2940, 1710, 1650, 1580, 1510, 1470, 1300, 1250, 1100, 1040  $cm^{-1}$ 

g) 溶解性:

易溶: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 水

h) 呈色反応:

陽性: 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応

陰性: ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応

i) <sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトル (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 図3に示す

$\delta$ (ppm):	9.96	(1H, s, 交換可能),
	9.02	(1H, d, J = 10 Hz),
	8.61	(1H, d, J = 11 Hz, 交換可能),
	7.36	(1H, dd, J = 8, 8 Hz),
	7.05	(1H, d, J = 16 Hz),
	6.94	(1H, d, J = 8 Hz),
	6.87	(1H, m),
	6.74	(1H, d, J = 8 Hz),
	6.49	(1H, dd, J = 12, 10 Hz),
	6.13	(1H, dd, J = 12, 7 Hz),
	5.94	(1H, d, J = 12 Hz),
	5.90	(1H, dd, J = 16, 7 Hz),
	5.74	(1H, br d, J = 12 Hz),
	5.14	(1H, m),
	5.06	(1H, m),
	3.98	(1H, m),
	3.93	(3H, s),
	3.73	(1H, m),
	3.54	(1H, m),
	3.04	(1H, br s, 交換可能),
	2.90	(1H, m),
	2.50	(1H, m).

j) <sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 図4に示す

$\delta$ (ppm):	169.9 (s), 162.2 (s), 160.5 (s), 147.7 (d),
	141.2 (s), 135.4 (d), 135.3 (d), 134.0 (d),
	129.0 (d), 127.5 (d), 124.6 (d), 124.3 (d),
	123.6 (d), 120.2 (d), 116.7 (d), 113.2 (s),
	108.1 (d), 75.0 (d), 67.8 (d), 62.3 (q),
	57.9 (d), 57.8 (d), 25.7 (t).

k) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -306^\circ$  (c = 0.5, CH<sub>3</sub>OH)

## (2) FR190872

- a) 形状: 淡黄色粉末  
 b) 分子式:  $C_{23}H_{21}N_2O_4$   
 c) 融点: 104-107°C  
 d) 分子量: 424 [FAB-MS:  $m/z$  425 (M + H)]  
 e) 紫外線吸収スペクトル: 図5に示す  
 $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH): 282, 305 (sh) nm  
 f) 赤外線吸収スペクトル: 図6に示す  
 $\nu_{max}$  (KBr): 3340, 3010, 2940, 1710, 1650, 1580, 1510, 1460, 1290, 1250, 1220, 1200, 1040  $cm^{-1}$   
 g) 溶解性:  
 易溶: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド  
 不溶: 水  
 h) 呈色反応:  
 陽性: 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応  
 陰性: ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応  
 i)  $^1H$ 核磁気共鳴スペクトル (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 図7に示す  
 $\delta$  (ppm): 10.75 (1H (OH), s, 交換可能),  
 9.02 (1H, d, J = 10.3 Hz),  
 8.39 (1H (NH), d, J = 9.9 Hz, 交換可能),  
 7.32 (1H, dd, J = 7.7, 7.9 Hz),  
 6.90-6.82 (3H, m),  
 6.75 (1H, d, J = 7.4 Hz),  
 6.72 (1H, dd),  
 6.50 (1H, dd, J = 10.7, 10.9 Hz),  
 6.41 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz),  
 6.30 (1H, d, J = 10.0 Hz),  
 6.09 (1H, d, J = 12.3 Hz),  
 5.92 (1H, d, J = 11.3 Hz),  
 5.73 (1H, d, J = 12.2 Hz),  
 5.30 (1H, dd, J = 4.5, 5.9 Hz),  
 4.82 (1H, m),  
 4.34 (1H, m),  
 3.94 (3H, s),  
 2.61 (1H, dd, J = 10.7, 12.3 Hz),  
 2.29 (1H, m).  
 j)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 図8に示す  
 $\delta$  (ppm): 170.9 (s), 162.6 (s), 162.1 (s), 147.7 (d),  
 140.9 (s), 135.4 (d), 134.1 (d), 133.3 (d),  
 132.8 (d), 130.8 (d), 130.7 (d), 130.1 (d),  
 127.0 (d), 126.0 (d), 124.5 (d), 121.7 (d),  
 117.4 (d), 110.0 (s), 104.5 (d), 77.5 (d),  
 72.8 (d), 62.3 (q), 27.7 (t).  
 k) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -12.4^\circ$  (c = 0.5, CH<sub>3</sub>OH)

## (3) FR190873

- a) 形状: 淡黄色粉末  
 b) 分子式:  $C_{23}H_{21}N_2O_4$   
 c) 分子量: 424 [FAB-MS:  $m/z$  425 (M + H)]  
 d) 紫外線吸収スペクトル: 図9に示す  
 $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH): 240 (sh), 282, 310 (sh) nm  
 e) 赤外線吸収スペクトル: 図10に示す

$\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3400, 3010, 2940, 1710, 1650, 1513, 1460, 1450,  
1290, 1260, 1220, 1120, 1043  $\text{cm}^{-1}$

## f) 溶解性:

易溶: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 水

## g) 呈色反応:

陽性: 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応

陰性: ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応

h)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 図11に示す

$\delta$  (ppm): 10.10 (1H (OH), br s, 交換可能),  
9.02 (1H, d,  $J = 11$  Hz),  
8.61 (1H (NH), d,  $J = 11$  Hz, 交換可能),  
7.36 (1H, dd,  $J = 8, 8$  Hz),  
7.23 (1H, d,  $J = 16$  Hz),  
7.08 (1H, d,  $J = 8$  Hz),  
6.95-6.85 (2H, m),  
6.65 (1H, dd,  $J = 7, 17$  Hz),  
6.52 (1H, dd,  $J = 11, 11$  Hz),  
6.40 (1H, dd,  $J = 4, 16$  Hz),  
6.38-6.33 (1H, m),  
6.17 (1H, dd,  $J = 4, 11$  Hz),  
5.97 (1H, d,  $J = 11$  Hz),  
5.82 (1H, m),  
5.09 (1H, m),  
5.00 (1H, m),  
4.60 (1H, m),  
3.92 (3H, s),  
2.75 (1H, m),  
2.55 (1H, m).

i)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 図12に示す

$\delta$  (ppm): 171.4 (s), 162.1 (s), 161.1 (s), 147.6 (d),  
139.2 (s), 137.5 (d), 135.4 (d), 134.2 (d),  
133.4 (d), 130.7 (d), 129.3 (d), 129.0 (d),  
126.9 (d), 124.4 (d), 124.4 (d), 117.8 (d),  
116.8 (d), 112.4 (s), 106.4 (d), 80.6 (d),  
72.0 (d), 62.3 (q), 25.3 (t).

j) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -7.7^\circ$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

【請求項2】 栄養培地中でシェードモナス(*Pseudomonas*)に属するFR190895、FR190872及びFR190873からなる群より選択される少なくとも1つの化合物の生産菌を培地に培養し、得られた培養物から該化合物を採取することを特徴とする請求項1に記載の化合物の製造方法。

【請求項3】 請求項1に記載の少なくとも1つの化合物を含有する医薬組成物。

【請求項4】 請求項1に記載の少なくとも1つの化合物を含有する細胞周期阻害剤。

【請求項5】 細胞周期阻害剤が、細胞周期をG<sub>1</sub>期で停止させるものである請求項4に記載の細胞周期阻害剤。

【請求項6】 癌抑制遺伝子産物p53非依存的に、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質p21/Cip1の発現を誘導する物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項7】 請求項1に記載の少なくとも1つの化合物を含有する抗腫瘍剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規化合物に関する。より詳しくは、本発明は、細胞周期阻害作用等を有する新規化合物、当該化合物の製造方法、並びにこの化合物の少なくとも1つを含有する医薬組成物に関する。

50 さらに、本発明は、癌抑制遺伝子産物p53非依存的

に、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質p21/Cip1の発現を誘導する物質を含有する抗腫瘍剤に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】従来の抗腫瘍剤には、核酸やタンパク質をアルキル化して不活化させるアルキル化剤（シクロホスファミドなど）、核酸合成の拮抗阻害剤（5-フルオロウラシルなど）、一部の抗生物質（アクチノマイシンDなど）及び植物アルカロイドなどがある。これらの物質はいずれも細胞毒性が強く、且つ選択毒性が低いため、正常細胞にも作用して強い副作用を示し、患者のQOL (quality of life) を損なう。また、当初、夢の抗腫瘍剤として注目されたインターフェロンや腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカインも期待されたほどの効果を挙げていない。

【0003】細胞の癌化は細胞周期調節機構の異常によって起こる。細胞周期制御の中心的役割を担うのは癌抑制遺伝子産物p53である。p53は、外的要因でDNAが損傷した際、遺伝子修復が完了するまで細胞周期をG<sub>1</sub>期で停止させ、損傷の程度の激しい細胞についてはアポトーシスを誘導して除去する機能を有する (Zabetti, G. P. and Levine, A. J., FASEB J., 7: 855-865, 1993)。また、p53を正常細胞で発現させても細胞死を誘導しない。p53は転写因子で、塩基特異的に遺伝子に結合し、転写を活性化させる (Greenblatt, M. S. et al., Cancer Res., 54: 4855-4878, 1994)。p53によって誘導されるタンパク質の中で、特に重要な機能を有するのがp21/Cip1 (以下、Cip1と略称する) である。Cip1はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) と複合体を形成してこの活性を抑制し、癌抑制遺伝子産物Rbタンパク質等の細胞周期関連タンパク質のリン酸化 (不活性化) を抑制する (Harper, J. W. et al., Cell, 75: 805-816, 1993) と共に、増殖細胞核抗原 (PCNA) と結合してDNAポリメラーゼ $\delta$ を阻害する (Xiong, Y. et al., Nature, 366: 701-704, 1993)。また、癌細胞で発現させるとG<sub>1</sub>期停止に続き、アポトーシスを誘導する。さらに、Cip1の発現には、血清刺激などによるp53非依存的な誘導経路があることが知られている (Noda, A. et al., Exp. Cell Res., 211: 90-98, 1994) が、そのメカニズムについては未知\*40

\*である。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、p53非依存的にCip1を大量に発現誘導し、細胞周期阻害活性を有する化合物、かかる化合物の製造方法及びかかる化合物等の用途を提供することを目的とする。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、シェードモナス属に属する細菌の培養物から新規化合物、FRFR190895、FR190872及びFR190873を分離し、且つ当該化合物が細胞周期阻害 (G<sub>1</sub>期停止) 活性を有するものであること、さらには当該化合物をはじめとする「癌抑制遺伝子産物p53非依存的に、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質p21/Cip1の発現を誘導する物質」が抗腫瘍作用を有する新知見を得た。

【0006】本発明は、細胞周期阻害 (G<sub>1</sub>期停止) 活性を有し、後記の物理化学的性質を有する新規化合物、FR190895、FR190872及びFR190873に関するものである。また本発明は、シェードモナス属に属するFR190895、FR190872及びFR190873生産細菌を培地に培養し、得られた培養物から該物質を採取することを特徴とする上記化合物の製造方法に関するものである。さらに本発明は、有効成分としてFR190895、FR190872及びFR190873を含有する医薬組成物である。さらにまた、本発明は上記本発明の化合物を含有する細胞周期阻害剤であり、特に細胞周期をG<sub>1</sub>期で停止させるものである細胞周期阻害剤である。さらにまた、本発明は癌抑制遺伝子産物p53非依存的に、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質p21/Cip1の発現を誘導する物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤であり、特に当該有効成分が上記本発明の化合物である抗腫瘍剤である。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】新規化合物FR190895、FR190872及びFR190873は以下の物理化学的性質を有する。

#### 【0008】

##### (1) FR190895

a) 形状: 淡黄色粉末

b) 分子式:  $C_{22}H_{24}N_2O_7$

c) 融点: 102-105°C

d) 分子量: 440 [FAB-MS: m/z 441 (M+H)]

e) 紫外線吸収スペクトル: 図1に示す

$\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH): 220 (sh), 273, 305 (sh) nm

f) 赤外線吸収スペクトル: 図2に示す

$\nu_{max}$  (KBr): 3370, 2940, 1710, 1650, 1580, 1510, 1470, 1300, 1250, 1100, 1040  $cm^{-1}$

## g) 溶解性:

易溶: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 水

## h) 呈色反応:

陽性: 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応

陰性: ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応

i)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 図3に示す

$\delta$ (ppm):	9.96	(1H, s, 交換可能),
	9.02	(1H, d, $J = 10$ Hz),
	8.61	(1H, d, $J = 11$ Hz, 交換可能),
	7.36	(1H, dd, $J = 8, 8$ Hz),
	7.05	(1H, d, $J = 16$ Hz),
	6.94	(1H, d, $J = 8$ Hz),
	6.87	(1H, m),
	6.74	(1H, d, $J = 8$ Hz),
	6.49	(1H, dd, $J = 12, 10$ Hz),
	6.13	(1H, dd, $J = 12, 7$ Hz),
	5.94	(1H, d, $J = 12$ Hz),
	5.90	(1H, dd, $J = 16, 7$ Hz),
	5.74	(1H, br d, $J = 12$ Hz),
	5.14	(1H, m),
	5.06	(1H, m),
	3.98	(1H, m),
	3.93	(3H, s),
	3.73	(1H, m),
	3.54	(1H, m),
	3.04	(1H, br s, 交換可能),
	2.90	(1H, m),
	2.50	(1H, m).

j)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 図4に示す

$\delta$ (ppm):	169.9 (s), 162.2 (s), 160.5 (s), 147.7 (d),
	141.2 (s), 135.4 (d), 135.3 (d), 134.0 (d),
	129.0 (d), 127.5 (d), 124.6 (d), 124.3 (d),
	123.6 (d), 120.2 (d), 116.7 (d), 113.2 (s),
	108.1 (d), 75.0 (d), 67.8 (d), 62.3 (q),
	57.9 (d), 57.8 (d), 25.7 (t).

k) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -306^\circ$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

## l) 薄層クロマトグラフィー:

シリカゲル,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 10 : 1$

$R_f = 0.46$

【0009】

## (2) FR190872

a) 形状: 淡黄色粉末

b) 分子式:  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$

c) 融点:  $104-107^\circ\text{C}$

d) 分子量: 424 [FAB-MS:  $m/z$  425 ( $M + H$ )]

e) 紫外線吸収スペクトル: 図5に示す

$\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): 282, 305 (sh) nm

f) 赤外線吸収スペクトル: 図6に示す

$\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3340, 3010, 2940, 1710, 1650, 1580, 1510, 1460,



1290, 1250, 1220, 1200, 1040  $\text{cm}^{-1}$ 

## g) 溶解性:

易溶: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶: 水

## h) 呈色反応:

陽性: 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応

陰性: ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応

i)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 図7に示す

$\delta$ (ppm): 10.75	(1H (OH), s, 交換可能),
9.02	(1H, d, $J = 10.3$ Hz),
8.39	(1H (NH), d, $J = 9.9$ Hz, 交換可能),
7.32	(1H, dd, $J = 7.7, 7.9$ Hz),
6.90-6.82	(3H, m),
6.75	(1H, d, $J = 7.4$ Hz),
6.72	(1H, dd),
6.50	(1H, dd, $J = 10.7, 10.9$ Hz),
6.41	(1H, dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz),
6.30	(1H, d, $J = 10.0$ Hz),
6.09	(1H, d, $J = 12.3$ Hz),
5.92	(1H, d, $J = 11.3$ Hz),
5.73	(1H, d, $J = 12.2$ Hz),
5.30	(1H, dd, $J = 4.5, 5.9$ Hz),
4.82	(1H, m),
4.34	(1H, m),
3.94	(3H, s),
2.61	(1H, dd, $J = 10.7, 12.3$ Hz),
2.29	(1H, m).

j)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 図8に示す

$\delta$ (ppm): 170.9	(s), 162.6 (s), 162.1 (s), 147.7 (d),
140.9	(s), 135.4 (d), 134.1 (d), 133.3 (d),
132.8	(d), 130.8 (d), 130.7 (d), 130.1 (d),
127.0	(d), 126.0 (d), 124.5 (d), 121.7 (d),
117.4	(d), 110.0 (s), 104.5 (d), 77.5 (d),
72.8	(d), 62.3 (q), 27.7 (t).

k) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -12.4^\circ$  ( $c=0.5$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

## l) 薄層クロマトグラフィー:

シリカゲル,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 10 : 1$  $R_f = 0.46$ 

【0010】

## (3) FR190873

a) 形状: 淡黄色粉末

b) 分子式:  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ c) 分子量: 424 [FAB-MS:  $m/z$  425 ( $M+H$ )]

d) 紫外線吸収スペクトル: 図9に示す

 $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): 240 (sh), 282, 310 (sh) nm

e) 赤外線吸収スペクトル: 図10に示す

 $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3400, 3010, 2940, 1710, 1650, 1513, 1460, 1450,  
1290, 1260, 1220, 1120, 1043  $\text{cm}^{-1}$ 

## f) 溶解性:

易溶: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド

不溶：水

g) 呈色反応：

陽性： 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応

陰性： ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応

h) <sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトル (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)： 図11に示す

δ (ppm) : 10.10	(1H (OH), br s, 交換可能),
9.02	(1H, d, J = 11 Hz),
8.61	(1H (NH), d, J = 11 Hz, 交換可能),
7.36	(1H, dd, J = 8, 8 Hz),
7.23	(1H, d, J = 16 Hz),
7.08	(1H, d, J = 8 Hz),
6.95-6.85	(2H, m),
6.65	(1H, dd, J = 7, 17 Hz),
6.52	(1H, dd, J = 11, 11 Hz),
6.40	(1H, dd, J = 4, 16 Hz),
6.38-6.33	(1H, m),
6.17	(1H, dd, J = 4, 11 Hz),
5.97	(1H, d, J = 11 Hz),
5.82	(1H, m),
5.09	(1H, m),
5.00	(1H, m),
4.60	(1H, m),
3.92	(3H, s),
2.75	(1H, m),
2.55	(1H, m).

i) <sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)： 図12に示す

δ (ppm) : 171.4 (s), 162.1 (s), 161.1 (s), 147.6 (d),
139.2 (s), 137.5 (d), 135.4 (d), 134.2 (d),
133.4 (d), 130.7 (d), 129.3 (d), 129.0 (d),
126.9 (d), 124.4 (d), 124.4 (d), 117.8 (d),
116.8 (d), 112.4 (s), 106.4 (d), 80.6 (d),
72.0 (d), 62.3 (q), 25.3 (t).

j) 比旋光度：  $[\alpha]_D^{25} = -7.7^\circ$  (c=0.1, CH<sub>3</sub> OH)

k) 薄層クロマトグラフィー：

シリカゲル, CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub> OH = 20 : 1

Rf = 0.48

【0011】本発明の化合物は、シュードモナス・クロロラフィスNo. 4306株のようなシュードモナス属に属するFR190895、FR190872及び／又はFR190873生産菌を培地に培養し、その培養物から該化合物を採取することにより調製され得る。シュードモナス属に属するFR190895、FR190872及び／又はFR190873生産菌のうち、シュードモナス・クロロラフィスNo. 4306株は、本発明者らによりメキシコから得られた土壌より新たに分離された。シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*) No. 4306株は、ブダペスト条約に基づく国際寄託機関である工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に1995年9月13日付で受託番号FERM BP-5232と

して寄託された。

【0012】本発明の化合物の生産は、ここに記載の特定の微生物の使用によるものに限定されないことを理解されたい。すなわち、少なくとも1つの本発明の化合物を生産できるいかなる自然又は人工の変異体の使用も包含するものであり、天然の変異体、およびX線照射、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアジニン、2-アミノプリン等を用いた処理のような慣用的方法により上述の微生物から誘導され得る人為的な変異体も含まれる。

【0013】シュードモナス・クロロラフィスNo. 4306株は以下の形態的及び生理的特徴を有する。

(1) 形態的特徴

栄養寒天培地上で30℃、24時間培養後、光学顕微鏡

及び電子顕微鏡により形態観察を行った。本菌株は、グラム陰性、運動性の桿菌で、大きさは $1.0-1.1 \times 2.0-4.0 \mu m$ であった。胞子形成はなかった。

#### 【0014】(2) 培養的特徴

本菌株の栄養寒天上でのコロニーの性状は、表面はスムーズ、灰黄色、円形、周縁は滑らかであった。また、バクト・シェードモナス寒天F培地上で水溶性の蛍光色素を生成した。さらに、緑色の色素(Chlororaphin色素)をコロニー上で結晶状に、そして培地中にも生成した。

#### 【0015】(3) 生理的特徴

本菌株の生理的特徴を表1及び表2に示す。本菌の生育温度範囲は $4^{\circ}C$ から $34^{\circ}C$ であった。本菌は、カタラーゼ、オキシダーゼ、クエン酸の資化性、硝酸塩の還元、ゼラチン加水分解、Tween 80加水分解、カゼイン\*

No. 4306株の生理的特徴(1)

\*加水分解及びアルギニンジヒドロラーゼの試験はいずれも陽性であった。O-F試験は酸化的であり、ピオベルジンの生成は陽性であった。インドール生成、澱粉の分解、ONPG試験はいずれも陰性であった。D-グルコース、D-キシロース、D-フルクトース、D-マンニトール、シュクロースより酸の生成がみられた。また、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンニトール、D-マンノース、D-トレハロース、グリセリン、イノシトール、シュクロース、N-アセチル-D-グルコサミン、グルコン酸、カプリン酸及びリンゴ酸を資化した。

#### 【0016】

#### 【表1】

生育温度範囲	4-34 $^{\circ}C$
至適生育温度	20-30 $^{\circ}C$
空気中での生育	陽性
マッコンキー寒天培地上での生育	陽性
カタラーゼ	陽性
オキシダーゼ	陽性
O-F試験	酸化的
クエン酸の資化性	陽性
硝酸塩の還元	陽性
インドール産生	陰性
H <sub>2</sub> S産生	陰性
エスカリン加水分解	陰性
澱粉加水分解	陰性
ONPG試験	陰性
DNase	陰性
ウレアーゼ	陰性
Tween 80加水分解	陽性
ゼラチン加水分解	陽性
カゼイン加水分解	陽性
アルギニンジヒドロラーゼ	陽性
糖より酸の産生	
D-グルコース	陽性
D-キシロース	陽性
D-フルクトース	陽性
D-マンニトール	陽性
シュクロース	陽性
ラクトース	陰性
サリシン	陰性
マルトース	陰性

【0017】

40. 【表2】

## No. 4306株の生理的特徴(2)

糖、有機酸の資化性	
D-グルコース	陽性
D-キシロース	陰性
D-フラクトース	陽性
D-マンニトール	陽性
D-ソルビトール	陰性
D-マンノース	陽性
D-トレハロース	陽性
グリセリン	陽性
イノシトール	陽性
ラクトース	陰性
シュクロース	陽性
サリシン	陰性
マルトース	陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	陽性
グルコン酸	陽性
カプリン酸	陽性
アジピン酸	陰性
リンゴ酸	陽性
酢酸フェニル	陰性

【0018】分類学的研究はBergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (Kreig, N.R. and Holt, J. G. ed., Williams and Wilkins company, Baltimore, 1984)及びManual for Identification of Medical Bacteria (Cowan, S.T. ed., Cambridge University Press, 1974)に記載された方法に従った。上記の特徴をもとに詳細に検討した結果、本菌はシュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*)と推定された。両菌株を比較検討した結果、両菌株の性質に大きな相違は認められなかった。以上より、本菌をシュードモナス・クロロラフィス No. 4306と同定した。

【0019】一般に、本発明の化合物は、本発明の化合物生産菌を同化し得る炭素源や窒素源を含む栄養培地中で、好ましくは好気性の条件下で培養することにより製造され得る(例えば、振とう培養、液内培養等)。栄養培地中の炭素源としては、好ましくはグルコース、フルクトース、グリセリン、スターチのような炭水化物である。またラクトース、アラビノース、キシロース、デキストリン、糖密等の他の炭素源を含有してもよい。窒素源としては、好ましくは酵母抽出物、ペプトン、グルテン粉、綿実粉、大豆粉、コーンステープリカー、乾燥酵母等、およびアンモニウム塩(例えば、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等)、尿素、アミノ酸等のような無機および有機窒素化合物である。炭素源および窒素源は、組み合わせて使用することが有利であるが、それらが純粋な形態で使用される必要はない。なぜなら、微量の成長因子と大量の無機質の栄養素を含む純度の低い材料も、また使用には適しているからである。所望により、炭酸カルシウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウム、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、マグネシウム塩、塩化コバルト等のよ

うな無機塩が培地に添加され得る。必要により、培養培地が非常に泡立つときは、流動パラフィン、高級アルコール、植物油、鉱物油またはシリコーンのような消泡剤が添加され得る。

【0020】本発明の化合物の大量生産の条件として、液内好気性培養条件が好ましい。少量生産には、フラスコまたは瓶中での振とうまたは表面培養が採用される。さらに大きいタンクで増殖を行うときには、本発明の化合物の製造工程での増殖の遅れを避けるために、増殖型(対数増殖期)の生産菌を製造タンク中への接種に使用することが好ましい。よって、望ましくは、生産菌を比較的少量の培地に接種し、培養する(前培養)ことにより、微生物の増殖型の接種物を製造し、そして、その前培養を無菌的に大きなタンクに移し、本培養に供する。増殖型の接種物を製造する培地としては、本発明の化合物生産菌の本培養に利用される培地と実質的に同一かまたは若干異なった培地が使用され得る。

【0021】培地混合物の攪拌および通気は、種々の方法で行われ得る。攪拌は、プロペラまたは同様の機械的な攪拌装置の使用、培養器の回転または振とう、種々のポンプ装置の使用、または減菌エアを培地に通すことにより行われ得る。通気は減菌エアを培養混合物に通すことにより行われ得る。培養は、通常約4℃〜約34℃、好ましくは約20℃〜約30℃の温度で、50時間〜100時間行われ、培養条件およびスケールに従って変え得る。このようにして製造された本発明の化合物は、抗生物質のような他の培養生産物の採取に一般に使用される慣用の方法により培養物から採取され得る。一般に、本発明の化合物は、培養物から、通常の溶媒を用いた抽出、減圧下での濃縮、凍結乾燥、pH調整、通常の樹脂を用いた処理(例えば、陰イオン又は陽イオン交

換樹脂、非イオン性吸着樹脂)、通常の吸着剤を用いた処理(例えば、活性炭、珪酸、シリカゲル、セルロース、アルミナ)、結晶化、再結晶等のような方法により分離される。

【0022】FR190895、FR190872及びFR190873の生理学的性質は、以下の試験で詳細に説明される。

試験例1 [FR190895、FR190872及びFR190873の抗菌、抗カビ活性]

FR190895、FR190872及びFR190873の数種の細菌、カビに対する抗菌活性をバルブ法により検討した。37℃で一晩培養後、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。その結果、FR190895、FR190872及びFR190873は、試験したグラム陽性菌、グラム陰性菌及びカビ(例えば、バチラス・サブチリス、スタフィロコッカス・アウレウス、エシェリシア・コリ、アスペルギルス1305)に対して、いずれも1000 µg/mlの濃度で抗菌活性を示さなかった。

【0023】試験例2 [FR190895、FR190872及びFR190873のインビトロ(in vitro)抗腫瘍活性]

癌細胞として、異なるp53遺伝子の状態を有する3種のヒト培養癌細胞株、A549ヒト肺腺癌(正常型p53)、HT29ヒト結腸腺癌(点変異型p53)及びHL-60ヒト白血病細胞(p53欠損型)を用いた。FR190895、FR190872及びFR190873の2倍順次希釈液(メタノール溶液)を10%牛血清、ペニシリンG(50 units/ml)及びストレ\*

\*プトマイシン(50 µg/ml)を添加したダルベッコ(Dulbecco)変法最少必須培地(以下、Dul完全培地と略す)50 µlを含む96穴マイクロ滴定プレート中に調製した。ヒト培養癌細胞株を、その細胞に最も好適な培地を用いてインビトロで継代後、濃度 $1 \times 10^5$  個/mlになるように調製した。この細胞懸濁液50 µlを各ウェルに注入し、37℃、5%の炭酸ガスを含有する加湿雰囲気中で7日間インキュベーションした後、Mosmannの方法(J. Immunol. Methods, 65: 55-63, 1983)に従い、MTT法により分析した。MTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、シグマ社製)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に5 mg/mlになるように溶解し、濾過滅菌して少量の不溶性残渣を除いた。このMTT溶液を培養終了後のヒト癌細胞株に加え(培地100 µlあたり10 µl)、さらに37℃で4時間インキュベーションした。酸性イソプロピルアルコール(0.04規定塩酸を含むイソプロピルアルコール)100 µlを各ウェルに加えて十分攪拌し、暗青色結晶を溶解させた後、マイクロプレートリーダー(Model MTP-120; Corona Electric Co., Ltd., Katsuta, Japan)を用いて660 nmをレファレンス波長として550 nmの吸光度を測定し、生細胞数を定量した。細胞生育を50%阻止するのに必要な物質濃度(IC<sub>50</sub>)を、薬理濃度の対数を薬物処理細胞の生育率に対してプロットして測定した。結果を表3に示す。

【0024】

【表3】

ヒト癌細胞に対する抗腫瘍活性

細胞株	IC <sub>50</sub> 値 (ng/ml)		
	FR190895	FR190872	FR190873
A549	1.28	0.67	8.01
HT-29	1.74	1.11	19.31
HL-60	20.1	13.2	-

【0025】試験例3 [FR190895及びFR190872のヒト癌細胞におけるCip1発現に及ぼす効果]

ヒト癌細胞株A549、HT29、HL-60(1×10<sup>6</sup> 個)を、10 cmペトリ皿(ベクトンディキンソン社製登録商標FALCON)でDul完全培地中24時間培養後、FR190895又はFR190872を添加※

※し、さらに16ないし24時間培養した。薬剤処理細胞を回収後、RNeasy Total RNA Kit (QIAGEN社製)を用いて添付プロトコールに従って全RNAを抽出した。RNA定量後、RNA PCR Kit (TaKaRa 社製)及びDNA Thermal Cycler 480 (PERKIN ELMER社製)を用いて添付プロトコールと常法に従ってCip1 mRNA (cDNA)の増幅を行った。プライマーは以下のものを用いた。

5'-primer 5'-AAGCTTGGATCCTCAGAGGAGGCGCCATGTCAGAA-3' (35mer)

3'-primer 5'-AAGCTTGGATCCTTCTGCGGCGATTAGGGCTTCCTC-3' (39mer)

上記プライマーの組合せにより、Cip1の全長cDNA 50 Aが増幅される。PCR反応液を2%アガロースゲル電

気泳動し、増幅断片を分析した。結果の一部を図13に示す。FR190895及びFR190872は、p53遺伝子の状態に関係なく、いずれの癌細胞においてもCip1 mRNAを誘導した。

【0026】試験例4〔FR190872のヒト癌細胞株における細胞周期に及ぼす効果〕

HT29細胞(1×10<sup>5</sup>個)を細胞培養皿(100×20mm、ベクトンディキンソン社製登録商標FALCON)に移し、Dul 完全培地で、FR190872(500μg/ml)存在下、37℃、5%の炭酸ガスを含む加湿雰囲気中で16時間培養した。5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU、シグマ社製)溶液(1mg/mlリン酸緩衝生理食塩水(PBS))を最終濃度30μg/mlとなるように培養液に加え、さらに30分培養し、被験細胞のDNAにBrdUを取り込ませた。被験細胞をトリプシンにて回収し、PBSで洗浄後、500μlのPBSに再懸濁させた。細胞懸濁液に5mlの冷70%水性エタノールを攪拌しながら加え、さらに4℃に30分間保ち細胞を固定した。0.5%仔牛血清及び0.1%Tween 20(半井化学社製)を含むPBS(洗浄液)で洗浄後、被験細胞単離核を700μlの4規定塩酸(和光純薬社製)に懸濁し、室温で30分間放置した。700μlの0.1規定四ホウ酸ナトリウム溶液(半井化学社製)で中和し、洗浄液で洗った後、20μlのフルオレセイン標識抗BrdU抗体溶液(ベクトンディキンソン社製)に懸濁し、室温で30分反応させた。洗浄液で洗った後、抗体処理単離核DNAをヨウ化プロビジウム溶液(10μg/ml PBS、シグマ社製)で染色した。FR190872の細胞周期遷移に対する効果は、フルオレッセンス・アクティ

【0027】試験例5(FR190895による癌細胞のアポトーシス誘導作用)

A549ヒト腺癌細胞をts-p53で形質転換したAP-3細胞(1×10<sup>5</sup>個)を、10cmペトリ皿でDul 完全培地にFR190895存在下、一定時間培養した。処理細胞を回収後、Cell Death Detection ELISA(Bioehringer mannheim社製)を用い、添付プロトコールに従って断片化DNAを定量した。その結果を図15に示す。FR190895は、処理後3日目よりAP-3細胞にアポトーシスによる細胞死の生化学的指標であるDNAの断片化を引き起こし、以後断片化DNA量は時間の経過とともに増加した。

【0028】試験例6(急性毒性)

FR190895を、ICRマウス(雌、6週齢)に経口投与した結果、LD<sub>50</sub>値は、>10mg/kgであった。

【0029】試験例7(血中濃度測定)

FR190895を、ICRマウス(雌、6週齢)に皮下投与した。採血は、クロロホルム麻酔下、心臓採血により行った。血漿を酢酸エチル抽出し、HPLCにて薬剤の血中濃度を定量した。結果を図16に示す。FR190895は極めて速やかに吸収されたが、血中持続時間は短かった。

【0030】本発明の化合物は、p53非依存的にCip1の発現を誘導し、細胞周期をG<sub>1</sub>期で停止させ、さらに、癌細胞に対してはG<sub>1</sub>期停止に続いてアポトーシスを誘導することにより強い抗腫瘍効果を示す。上記の生物学的特徴から、本発明の化合物は、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウサギ、ウシ、ブタ)用の医薬として使用され、特に細胞周期阻害剤、ひいては抗腫瘍剤として有用である。

【0031】本発明の化合物は、医薬上許容できる担体との混合物として、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウサギ、ウシ、ブタ)に、カプセル、錠剤、顆粒剤、散剤、パッカ錠、舌下錠及び液剤のような医薬組成物の形態で経口又は非経口投与され得る。医薬上許容できる担体は、薬学的な目的のために通常使用される種々の有機または無機の担体物質を含有し得、具体的にはフィルム賦形剤(例えば、ショ糖、スターチ、マンニト、ソルビット、ラクトース、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等)、結合剤(例えば、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、スターチ等)、崩壊剤(例えば、スターチ、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースのカルシウム塩、ヒドロキシプロピルスターチ、グリコールスターチのナトリウム塩、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等)、潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等)、着香剤(例えば、クエン酸、メントール、グリシン、オレンジパウダー等)、防腐剤(例えば、安息香酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等)、安定化剤(例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等)、沈殿防止剤(例えば、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等)、分散剤(例えば、表面活性剤等)、水性の希釈剤(例えば、水)、油(例えば、ゴマ油)、基剤ワックス(例えば、カカオバター、ポリエチレングリコール、白色ワセリン等)が挙げられる。

【0032】本発明の化合物の投与量は、疾患の種類、患者の体重及び/又は年齢、さらには投与経路の種類の

ような種々の要因に依存して変わり得る。本発明の化合物の最適投与量は、経口又は注射、外用剤等の非経口的に0.05~50mg/kg/日の範囲内から適宜選択される。

#### 【0033】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 【0034】実施例1

(1) シュードモナス・クロロラフィスNo. 4306株の培養

ポリペプトン(1%)、酵母エキス(0.5%)、塩化ナトリウム(0.5%)の組成の種培地を500ml容エルレンマイヤーフラスコに160ml加え、120℃で30分間滅菌した。それらにNo. 4306株の斜面培養物を白金耳ずつ接種し、ロータリーシェーカーで毎分250回転、30℃で24時間振とう培養した。予めグルコース(2%)、グリセリン(3%)、脱脂大豆粉(2%)、コーンステープリカー(0.2%)、鰹肉エキス(0.1%、和光純薬)、硫酸アンモニウム(0.2%)、硫酸マグネシウム(0.01%)及び炭酸カルシウム(0.1%)の組成の培地(pH7.0)4.8Lを30本の500ml容エルレンマイヤーフラスコに160mlずつ注入し、120℃で30分間滅菌した後、上記培養物を3.2mlずつ接種して、ロータリーシェーカーで毎分250回転、25℃で4日間振とう培養した。

【0035】(2) FR190895、FR190872及びFR190873の分離及び精製

培養終了後、培養物(4.8L)に等量のアセトンを加え、室温で1時間抽出した後、珪藻土200gを添加し、濾過した。得られた濾液(9L)を5Lまで減圧濃縮し、pH7.0に調整した後、等量の酢酸エチルを加えて抽出した。抽出残渣に再び酢酸エチルを加え、抽出を繰り返した。得られた抽出液を減圧濃縮し、得られた油状物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(100ml、うち50mlをまぶしとした)に付した。このカラムをn-ヘキサン(300ml)、n-ヘキサン及び酢酸エチル(3:1;v/v)の混液(300ml)で洗った後、n-ヘキサン及び酢酸エチル(1:1;v/v)の混液(300ml)で溶出した。細胞周期阻害活性を有する溶出液(活性は温度感受性変異型p53でトランスフォームしたヒト肺腺癌A549細胞を用いてモニターした)を減圧濃縮し、得られた油状物質を再びシリカゲルカラムクロマトグラフィー(100ml)に付した。カラムをジクロロメタン(300ml)、ジクロロメタン及びメタノール(100:1;v/v)の混液(300ml)並びにジクロロメタン及びメタノール(50:1;v/v)の混液(300ml)で洗った後、ジクロロメタン及びメタノール(25:1;v/v)の混液(300ml)で溶出した。活性溶出液を減圧濃縮し、得られた油状物質を20mlのメタノールに溶解した。該メタノール溶液を逆相樹脂「YMC ODS-AM」(商標、YMC社製)(ODS-AM120-S-50タイプ)を充填したカラムに付した。カラムを70%水性メタノールで展開し、各活性画分を減圧濃縮、乾燥してFR190895、FR190872及びFR190873の淡黄色粉末をそれぞれ250mg、200mg及び15mg得た。

【0036】

【発明の効果】以上の説明で明らかなように、本発明の化合物は、p53非依存的にp21/Cip1の発現を誘導し、細胞周期をG<sub>1</sub>期で停止させるとともに、癌細胞に対しては、G<sub>1</sub>期停止に引き続いてアポトーシスを誘導し、その増殖を抑制する作用を示す新規化合物である。そのため、哺乳動物に対する抗腫瘍剤として有効であると考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】FR190895の紫外線吸収スペクトルを示すチャートである。

【図2】FR190895の赤外線吸収スペクトルを示すチャートである。

【図3】FR190895の<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルを示すチャートである。

【図4】FR190895の<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトルを示すチャートである。

【図5】FR190872の紫外線吸収スペクトルを示すチャートである。

【図6】FR190872の赤外線吸収スペクトルを示すチャートである。

【図7】FR190872の<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルを示すチャートである。

【図8】FR190872の<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトルを示すチャートである。

【図9】FR190873の紫外線吸収スペクトルを示すチャートである。

【図10】FR190873の赤外線吸収スペクトルを示すチャートである。

【図11】FR190873の<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルを示すチャートである。

【図12】FR190873の<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトルを示すチャートである。

【図13】FR190895及びFR190872のヒト癌細胞におけるp21/Cip1の発現誘導効果を示す電気泳動写真である。

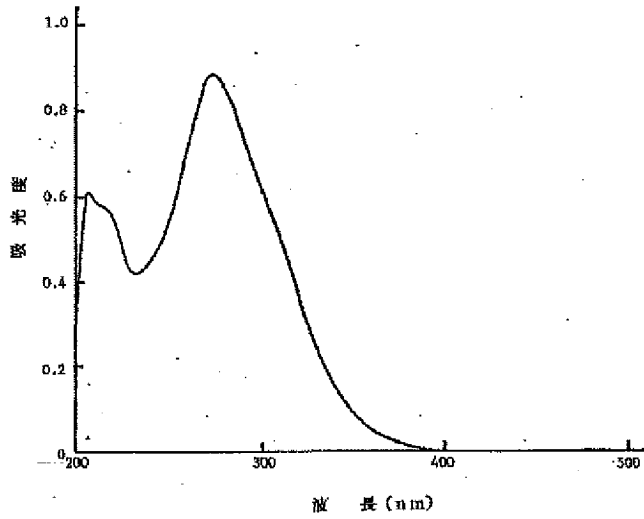
【図14】FR190872の細胞周期阻害効果を示すプロットである。

【図15】FR190895の癌細胞のアポトーシス誘導効果を示すプロットである。

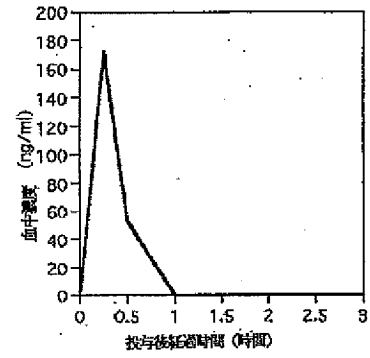
【図16】FR190895の血中濃度の経時変化を示すチャートである。

すプロットである。

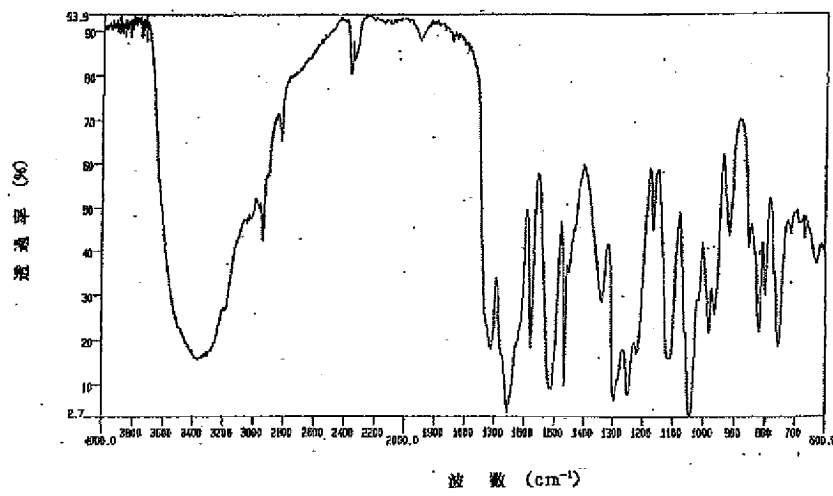
【図1】



【図16】

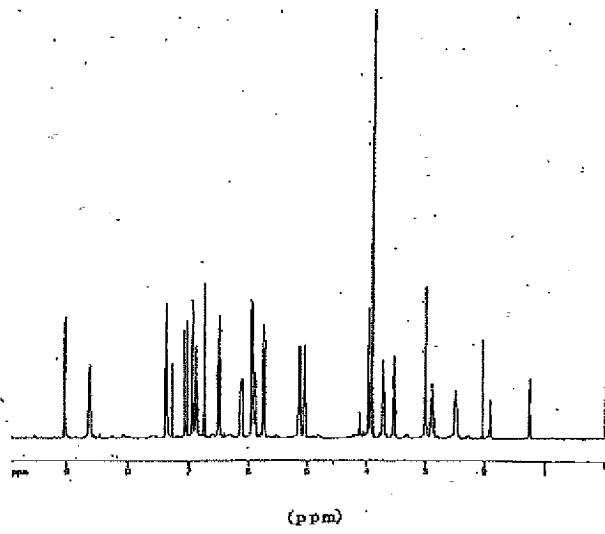


【図2】

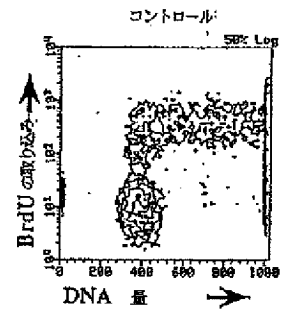




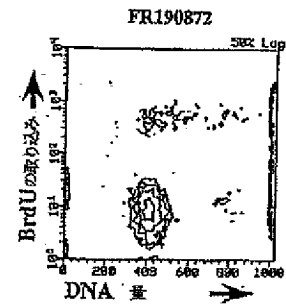
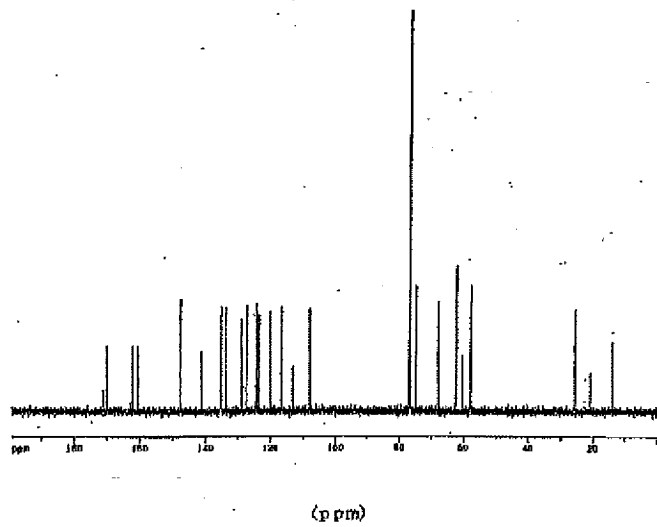
【図3】



【図14】



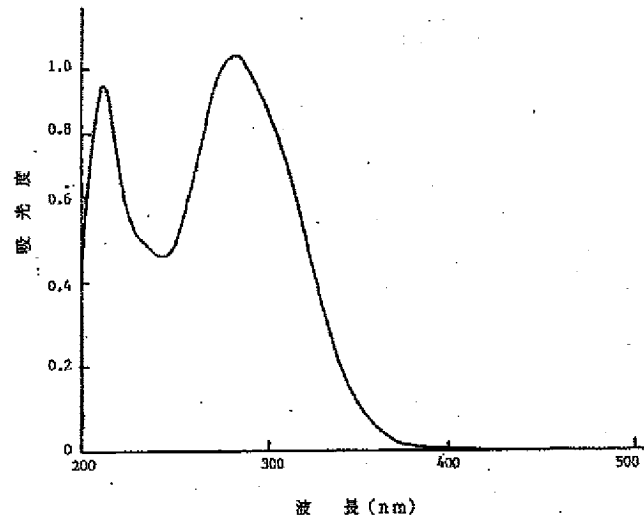
【図4】



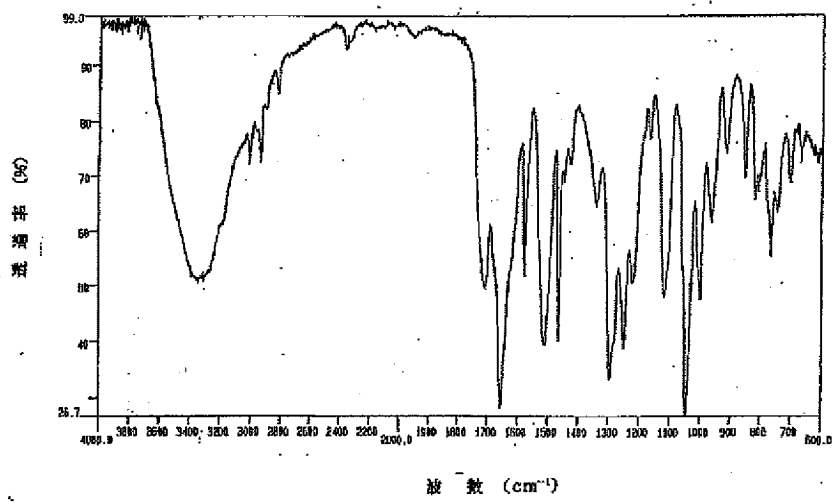
(16)

特開平9-100289

【図5】



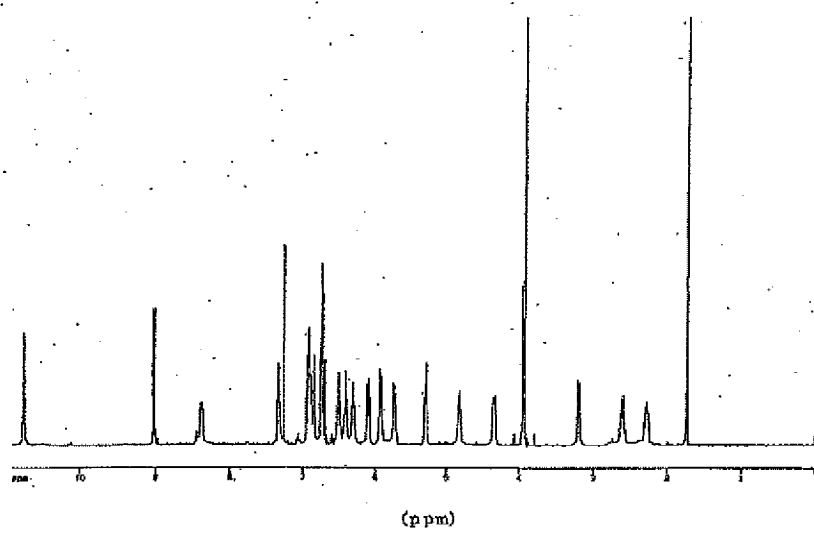
【図6】



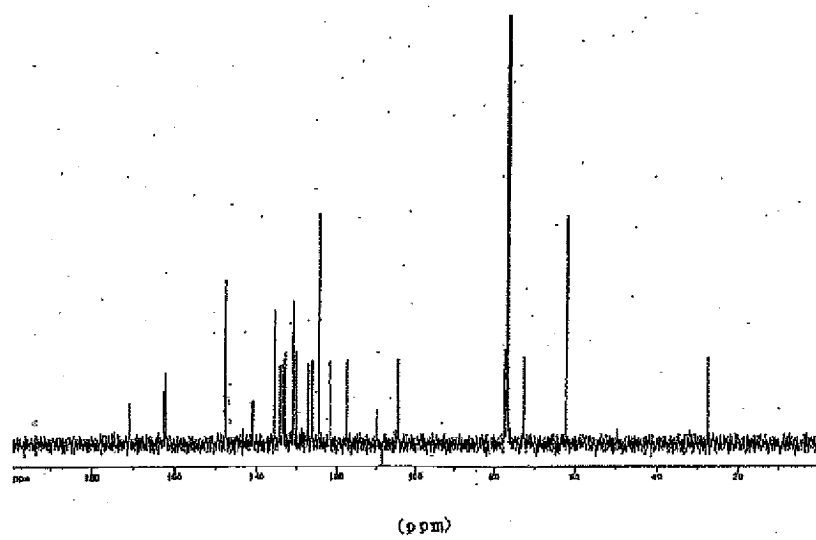
(17)

特開平9-100289

【図7】



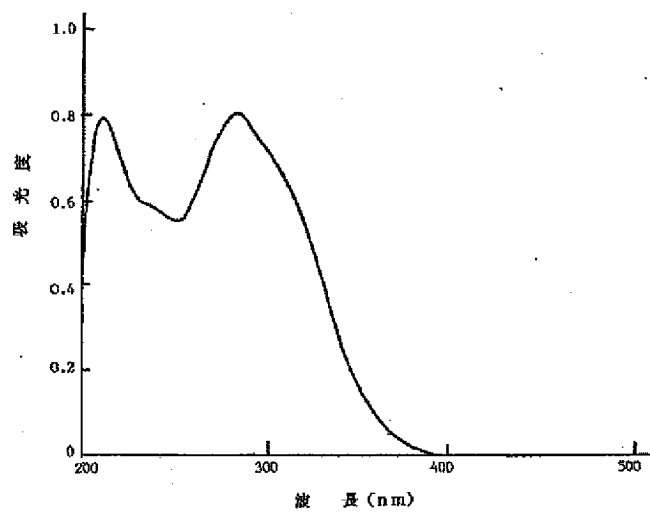
【図8】



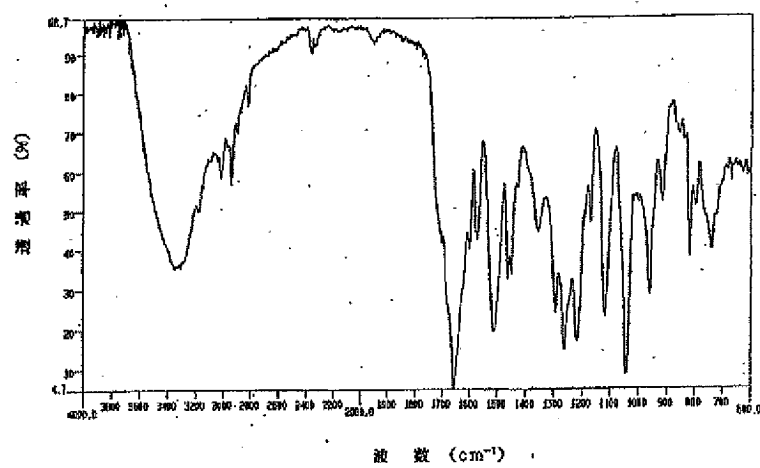
(18)

特開平9-100289

【図9】



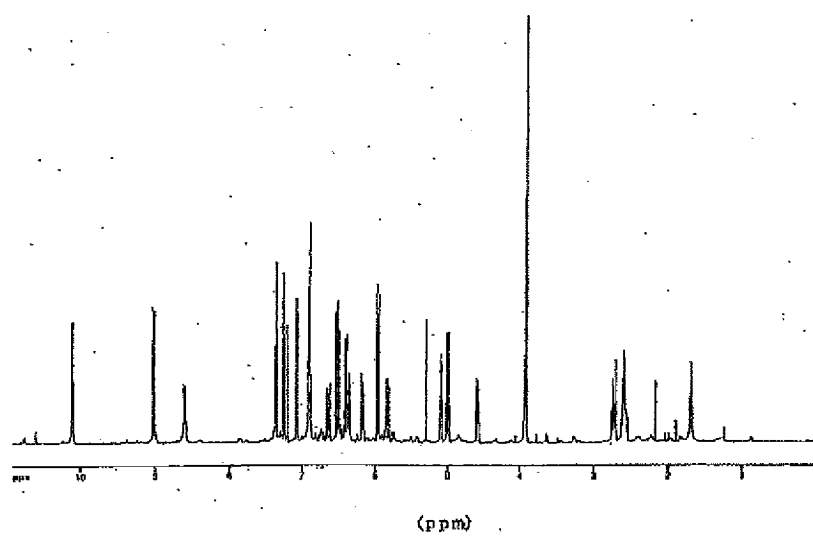
【図10】



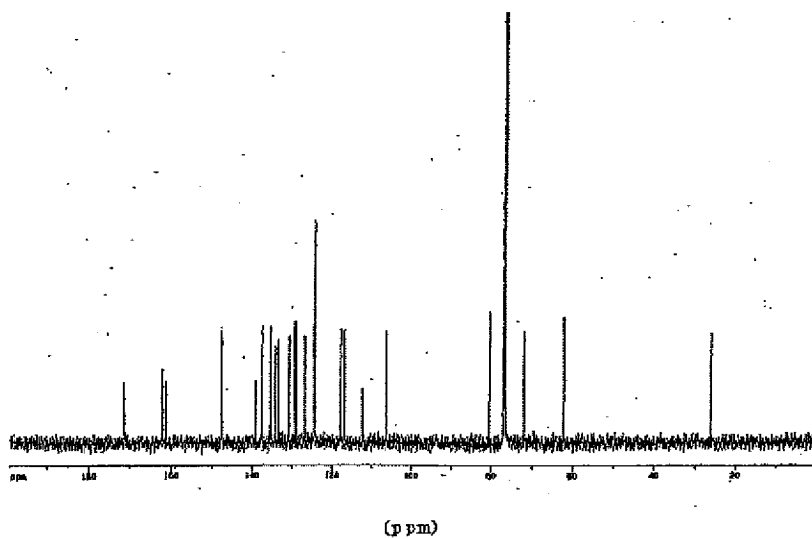
(19)

特開平9-100289

【図11】



【図12】



【図13】

図13 作用原理

HL-60

1 2



1. コントロール
2. FR190872 (500ng/mL)

HT-29

1 2



1. コントロール
2. FR190872 (500ng/mL)

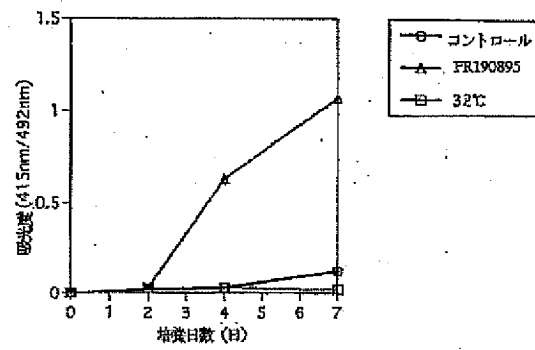
A649

1 2 3



1. FR190895 (500ng/mL)
2. FR190895 (500ng/mL)
3. コントロール

【図15】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 1/04

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:38)

(72)発明者 高瀬 茂弘

茨城県石岡市総社1-12-10

(72)発明者 寺野 紘

茨城県土浦市真鍋2600-3